

Doktori értekezés tézisei

# **Jelátviteli útvonalak kapcsolata és azok gátlása egészséges és RA-s B sejtekben**



**Szili Dániel**

Témavezető:  
**Prof. Sármay Gabriella**

Biológiai Doktori Iskola  
Immunológia doktori program  
Programvezető: Prof. Erdei Anna

ELTE TTK, Biológiai Intézet  
Immunológiai Tanszék, Budapest

2014

## Bevezetés

A B limfociták a humorális immunválasz fő mediátorai. Alulműködésük esetén immundeficiencia, túlműködésük esetén autoimmun betegségek alakulhatnak ki. Számos aktiváló és gátló receptor szabályozza egyidejűleg ezen sejtek működését, és az aktiváló és gátló szignálok eredője határozza meg a B sejt válaszkimenetét. Az antigén kötődése a B sejt receptorhoz (BCR) antigén-specifikus humorális immunválaszt indukál, ám emellett számos egyéb nem antigén-specifikus stimulus is képes befolyásolni a B sejtek aktivációját. A Toll-szerű receptorok (TLRs) számos patogén-asszociált molekuláris mintázatot képesek felismerni, míg a B sejt aktiváló faktor (BAFF) receptora (BAFF-R) a B sejtek túlélésében játszik fontos szerepet [1, 2]. Irodalmi adatok alapján a receptorok közötti párbeszéd nagymértékben befolyásolhatja a B sejt immunválasz kimenetét [3, 4], ezért ennek vizsgálata szükséges a B sejt aktiváció finom szabályozásának és az autoimmun betegségek kialakulásának jobb megértéséhez.

A Fas (CD95) az alacsony affinitású, potenciálisan autoreaktív B sejtek apoptózist váltja ki. További túlélő szignálok (BAFF) megmenthetik ezeket a sejteket a Fas indukálta sejthaláltól, növelve ezzel az autoimmun betegségek kialakulásának kockázatát [5].

A reumatoid arthritisz (RA) egy autoimmun betegség, melynek kialakulásában fontos szerepet játszanak az autoreaktív B sejtek. Hatékony kezelése az anti-CD20 (Rituximab) ellenanyag terápia, mely a perifériás B limfociták deplécióját idézi elő. A Xencor cég által előállított, módosított Fc részű anti-CD19 monoklonális ellenanyag (XmAb5871) ~400X nagyobb affinitással kötődik az FcγRIIb-hez a megfelelő, vad típusú IgG1-hez képest. Az XmAb5871 a CD19 és az FcγRIIb keresztkötésével képes gátolni a B sejtek aktivációját azok depléciója nélkül [6].

Doktori dolgozatom célja megvizsgálni a B sejtek BAFF-R, BCR és TLR9-en keresztüli aktiválhatóságát és a receptorok közötti együttműködést, jelátviteli és funkcionális szinten, ezek megmentő hatását a Fas receptoron keresztül indukált apoptózisra, valamint ezeknek a stimulusoknak a gátolhatóságát a fokozott FcγRIIb-hez való kötőképességgel rendelkező, XmAb5871 monoklonális anti-CD19 ellenanyag által.

## **Célkitűzések / I.**

### **A BAFF, a BCR és a TLR9 által indukált jelek kölcsönhatásának vizsgálata humán B sejteken**

A BCR mellett a BAFF-R és a TLR9 B sejtekre kifejtett hatása ismert, ám a BAFF és TLR9 által indukált jelek közötti kooperáció humán B limfocitákon eddig még nem vizsgált. Célul tűztük ki:

- ❖ a BAFF, BCR és TLR9 kooperációjának vizsgálatát humán B limfociták jelátvitelében, illetve proliferációjában, citokin és ellenanyag termelésében.
- ❖ a TAK1 szerepének vizsgálatát az említett funkciókban.
- ❖ összehasonlítani egészséges és aktív RA-s betegek perifériás B limfocitáinak aktivációs állapotát, és megmérni ezek válaszképességét BCR és TLR9 stimulusokra.

## **Célkitűzések / II.**

### **A BAFF, a BCR és a TLR9 szerepe a Fas által közvetített sejthalál folyamatában**

A halál receptorok családjába tartozó Fas kiemelkedően fontos szerepet játszik a folyamatosan képződő nem-specifikus és autoreaktív B sejtek elpusztításában. Az irodalomból ismert, hogy hibás Fas jelátvitel vagy erős B sejt aktiváció hatására a B sejtek

megmenekülhetnek az apoptózis alól, ezért célunk volt megvizsgálni A20 B limfocita sejtvonalon:

- ❖ a BAFF, BCR és TLR9 által indukált szignálok megmentő hatását a Fas indukálta sejthalálra.
- ❖ a BCR és TLR9 kaszpáz kaszkádra kifejtett hatását.

### **Célkitűzések / III.**

#### **Az XmAb5871 hatása humán B limfociták aktivációjára**

A RA kezelésére használt anti-CD20 terápia hatékonyan eliminálja a keringésben lévő autoreaktív B sejteket a teljes B sejt populációval együtt. Az újonnan kifejlesztett, módosított Fc részű anti-CD19 monoklonális ellenanyag, az XmAb5871 a CD19 és az FcγRIIb keresztkötésén keresztül képes gátolni a B sejteket azok depléciója nélkül. Célunk volt annak vizsgálata, hogy:

- ❖ milyen mértékben csökkenti a BCR és TLR9-en keresztüli B sejt aktiválást az XmAb5871.
- ❖ az XmAb5871 képes-e RA-es betegek véréből izolált B sejtek autoantigén specifikus ellenanyagtermelését gátolni.

### **Alkalmazott módszerek**

- ❖ B-sejtek izolálása vérből és mandulából, sejtenyésztés
- ❖ Sejtproliferáció vizsgálata (CFSE)
- ❖ Citokintermelés mérése (FlowCytomix módszer)
- ❖ Plazmablaszt differenciáció

- ❖ ELISPOT (totál és peptid-specifikus IgG-termelő sejtek detektálása)
- ❖ ELISA (citrullinált peptid-specifikus ellenanyagok detektálása szérumból)
- ❖ Áramlási citofluorimetria
- ❖ Phospho-flow
- ❖ Western Blot

## **Eredmények és tárgyalásuk / I.**

### **A BCR és a TLR9 közvetített jelek TAK1-től függő módon, szinergisztikusan aktiválják az emberi B sejteket**

- ❖ Kimutattuk, hogy a BCR és TLR9 által stimulált jelpályák a TAK1 MAPKKK szintjén lépnek kölcsönhatásba és szinergikusan aktiválják a MAPK és az NFκB útvonalat, míg az AKT és az általa aktivált FOXO1 transzkripciós faktor a BCR irányítása alatt áll. A BAFF kezelés IκB és p38 foszforilációt váltott ki, de összességében gyenge aktivátornak bizonyult mind jelátviteli, mint funkcionális szinten. A BCR és TLR9 közötti szinergia a sejtek proliferációjában, IL-6, IL-10 és TNFα termelésében, illetve a TAK1 gátolt minták esetén a plazmasejt differenciáció szintjén is megnyilvánult.
- ❖ Bebizonyítottuk, hogy a TAK1 központi szerepet játszik a BCR és a TLR9 által kiváltott szinergisztikus B sejt aktivációban, mivel a TAK1 gátlása jelentősen lecsökkentette mind a BCR, a TLR9 és a kettősen stimulált mintákban kapott válaszokat.
- ❖ Korábbi eredményekkel összhangban igazoltuk az aktív RA-es betegek perifériás B sejtjeinek aktivált állapotát, továbbá kimutattuk, hogy ez az aktivált alapállapot befolyással bír a sejtek BCR és TLR9 stimulusra adott válaszára.

*Ezekkel a vizsgálatokkal felderítettük a BCR és a TLR9 közötti párbeszéd módját és a BAFF erre kifejtett gyengén módosító hatását mind jelátviteli, mind funkcionális szinten, továbbá egyértelműen bebizonyítottuk, hogy a TAK1 központi szerepet játszik a BCR és a TLR9 által kiváltott B sejt aktivációban. Rávilágítottunk arra is, hogy az ezekre a szignálokra adott válaszképesség az aktivált háttérrel rendelkező RA-es betegekből izolált B sejtekben csökkent az egészséges kontroll B sejtekhez képest.*

## **Eredmények és tárgyalásuk / II.**

### **A BAFF, BCR és TLR9 stimulus képes megmenteni a Fas indukálta sejthaláltól az A20 sejteket a kaspáz 8 inaktivációján keresztül**

- ❖ Igazoltuk, hogy az anti-Ig, BAFF és CpG stimulusok hatékonyan gátolják a Fas közvetítette apoptózist, valamint, hogy ez a hatás a ko-stimulált mintákban a legerősebb.
- ❖ Bebizonyítottuk, hogy a BCR és a TLR9 által közvetített, Fas indukált apoptózisból való megmentés a kaspáz kaskád működésének gátlásán keresztül történik.
- ❖ Kimutattuk, hogy a BCR és TLR9 stimuláció az apoptózis kiváltásában kulcsszerepet játszó kaspáz 8 molekula működését gátolja, így hatékonyan menti meg a B sejteket a Fas indukált sejthaláltól.

*Eredményeink azt igazolják, hogy a BAFF, BCR és TLR9 stimulusok a kaspáz kaskád, illetőleg az iniciátor kaspáz 8 gátlásán keresztül hatékonyan akadályozzák meg a B sejtek apoptózisát. Kimutattuk, hogy az egyes stimulusok erősítik egymás megmentő hatását,*

*ami rávilágít ezeknek a jelátviteli útvonalaknak az autoreaktív B sejtek képződésében betöltött szerepére.*

### **Eredmények és tárgyalásuk / III.**

#### **Az XmAb5871 az FcγRIIb-n keresztül gátolja a emberi B sejtek BCR és TLR9, valamint a kettős szignál által kiváltott aktivációját**

- ❖ Kimutattuk, hogy az XmAb5871 általi CD19 és FcγIIb keresztkötés elegendő az FcγRIIb foszforilációjához.
- ❖ Kimutattuk, hogy a BCR és TLR9 által indukált AKT és ERK foszforiláció, valamint a BCR által kiváltott  $\text{Ca}^{2+}$  felszabadulás az XmAb5871 kezelés hatására jelentősen csökkent.
- ❖ Az XmAb5871 mediált gátlás a B sejtek proliferációjában, citokin termelésében és plazmasejt differenciációjában is megmutatkozik.
- ❖ Citrullinált filaggrin-specifikus auto-antitestekkel rendelkező RA-es betegekből izolált B sejteken igazoltuk, hogy az XmAb5871 az autoantigén epitópra adott *in vitro* immunválaszt gátolja a plazmasejtek differenciálódásának gátlásán keresztül.

*Eredményeink arra utalnak, hogy az FcγRIIb-n keresztül a BCR mellett a TLR9 által indukált jelek is gátolhatók. Kimutattuk, hogy az XmAb5871 nemcsak a B sejtek proliferációja és gyulladásos citokinek termelésének gátlásán keresztül, hanem a patogén autoantitest képző plazmasejtek számának csökkentésén keresztül is hatékony terápiás lehetőség lehet a RA-es betegek számára.*

## Összefoglalás

Összességében elmondhatjuk, hogy a fiziológiás körülmények között jelen lévő aktiváló szignálok hatékonyan, egymással együttműködve aktiválják a B sejteket. A BCR és a TLR9 - TAK1 függő módon - szinergisztikusan aktiválja a MAPK és NFκB útvonalakat, valamint a sejtek proliferációját, citokin és ellenanyag termelését.

A BAFF, BCR és TLR9 közvetített jelek megmentő szignálokat biztosítanak a B sejtek számára, és képesek - részben a kaszpáz 8 inaktivációján keresztül - megvédeni a sejteket a Fas indukálta apoptózistól.

Kimutattuk, hogy az XmAb5871 monoklonális ellenanyag a CD19 és az FcγRIIb keresztkötésén keresztül gátolja a BCR és TLR9 közvetített sejtaktivációt, továbbá a RA-re jellemző, citrullinált filaggrin-specifikus plazmasejtek képződését.

Eredményeink azt mutatják, hogy az egyes aktiváló szignálok hatásai összeadódva, illetve egymást tovább fokozva jelentős hatással lehetnek a B sejtek életére, ami komoly következményekkel járhat az egész immunválasz kimenetele szempontjából. Eredményeink azt jelzik, hogy a TAK1 célzott gátlása, ill. az XmAb5871 alkalmazása hatékonyan ellenszere lehet a kóros B sejtés aktivációval járó betegségeknek.

## Irodalomjegyzék

1. Kawai, T. and S. Akira, *TLR signaling*. Semin Immunol, 2007. 19(1): p. 24-32.
2. Schiemann, B., et al., *An essential role for BAFF in the normal development of B cells through a BCMA-independent pathway*. Science, 2001. 293(5537): p. 2111-4.
3. Yi, A.K., J.G. Yoon, and A.M. Krieg, *Convergence of CpG DNA- and BCR-mediated signals at the c-Jun N-terminal kinase and NF-kappaB activation pathways: regulation by mitogen-activated protein kinases*. Int Immunol, 2003. 15(5): p. 577-91.



4. Harless Smith, S. and M.P. Cancro, *Integrating B cell homeostasis and selection with B<sub>L</sub>yS*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2003. 51(4): p. 209-18.
5. Kalled, S.L., *BAFF: a novel therapeutic target for autoimmunity*. Curr Opin Investig Drugs, 2002. 3(7): p. 1005-10.
6. Chu, S.Y., et al., *Inhibition of B cell receptor-mediated activation of primary human B cells by coengagement of CD19 and FcγRIIb with Fc-engineered antibodies*. Mol Immunol, 2008. 45(15): p. 3926-33.

### **Az értekezéshez kapcsolódó saját közlemények**

1. Szili D, Bankó Z, Tóth EA, Nagy G, Rojkovich B, Gáti T, Simon M, Hérincs Z, Sármai G.  
TGFβ Activated Kinase 1 (TAK1) at the Crossroad of B Cell Receptor and Toll-Like Receptor 9 Signaling Pathways in Human B Cells  
PLoS One, 9(5):e96381., (2014), IF: 3,73
2. Szili D, Cserhalmi M, Bankó Z, Nagy G, Szymkowski DE, Sarmay G.  
Suppression of innate and adaptive B cell activation pathways by antibody coengagement of FcγRIIb and CD19  
mAbs, [Epub ahead of print], (2014), IF: 5.275
3. Hancz A, Koncz G, Szili D, Sármai G.  
TLR9-mediated signals rescue B-cells from Fas-induced apoptosis via inactivation of caspases  
Immunol Lett., 143(1):77-84., (2012), IF: 2,33

### **Egyéb közlemények**

1. Kövesdi D, Angyal A, Huber K, Szili D, Sármai G.  
T-bet is a new synergistic meeting point for the BCR and TLR9 signaling cascades  
Eur J Immunol., 44(3):887-93., (2014), IF: 4,97
2. Vajna B, Szili D, Nagy A, Márialiget K.

An improved sequence-aided T-RFLP analysis of bacterial succession during oyster mushroom substrate preparation

Microb Ecol., 64(3):702-12., (2012), IF: 3,27

### **Publikált absztraktok**

1. Szili D, Hancz A, Pozsgay J, Hérincs Z, Koncz G, Sármay G

Cooperation between signalling pathways leading to survival, proliferation or death of B cells

*ANNALS OF THE RHEUMATIC DISEASES* 70: Paper 2 A15. (2011)